

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

TOKSIČNOST NANOESTETICA SREBRA I ZLATA

TOXICITY OF GOLD AND SILVER NANOPARTICLES

SEMINARSKI RAD

Kristina Zec
Preddiplomski studij Molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Goran Klobučar

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ

1. Uvod	
2. Toksi nost nano estica zlata	
2.1 Stabilnost nano estica zlata ovisi o površinskim konjugatima	5.
2.2 <i>In vitro</i> studije citotoksi nosti nano estica zlata	6.
2.3 Imunogeni nost nano estica zlata	6.
2.4 Utjecaj nano estica zlata na stani nu morfologiju	8.
2.5 Akutna oralna toksi nost nano estica zlata u miša	9.
2.6 Biodistribucija i bubrežna ekskrecija nano estica zlata	11.
2.7 Genotoksi nost nano estica zlata	12.
2.8 Mutageni u inak nano estica zlata na modelu vinske mušice	13.
3. Toksi nost nano estica srebra	
3.1 <i>In vitro</i> studije toksi nosti nano estica srebra	14.
3.2 <i>In vivo</i> studije toksi nosti nano estica srebra	15.
3.3 Molekularni mehanizmi toksi nosti nano estica srebra	15.
4. Zaklju ak	16.
5. Literatura	17.
6. Sažetak	18.
7. Summary	18.

1. UVOD

Nanotehnologija podrazumijeva sintezu i primjenu estica promjera manjeg od 100 nanometara te proučava njihove interakcije s biološkim strukturama na molekularnom nivou i njihov utjecaj na biologiju organizama općenito te u nekom sveobuhvatnom pogledu njihov ekološki utjecaj.

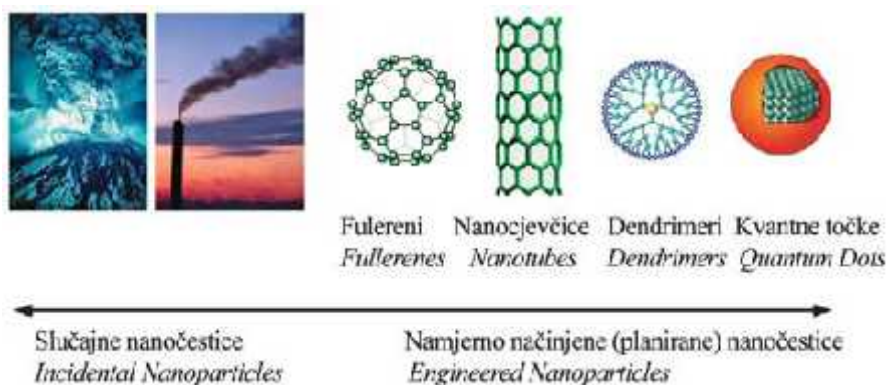
Fizikalna svojstva nano estica razlikuju se bitno od svojstava estica veće dimenzije. Bilo koji materijal sveden na veličinu u nanometrima ima drugačija svojstva koja ponekad mogu rezultirati u neekvivanom ponašanju tog materijala. Npr. izolatori postanu vodljivi, netopljive tvari topljivima jer na vidjelo izlaze kvantno mehaničke značajke pojedinih atoma unutar materijala.

Iako je nanotehnologija relativno mlada znanost, ovjeka su nano estice bile poznate od davnina. Kinezi su bili prvi koji su pripremali i koristili crveno koloidno zlato kao alkemijski lijek za dugovječnost 2500 p.n.e. Riječ alkemija ima korijen u dvije kineske riječi: *Kim* (zlato) i *Yeh* (sok). Složenica *Kimyeh* (zlatni sok) je ušla u arapski jezik kao *kimiya* te sa određenim izmjenama tvorila *alkimiya*, što je u zapadnom svijetu dalo riječ alkemija. Srednjovjekovni alkemičari tražili su načine za pripremu suspenzija metala koje bi mogli piti: aurum potable (pitko zlato) i luna potable (pitko srebro) za koje su vjerovali da su eliksiri života (Prema Shukla R., 2007).

Nanotehnologija danas ima vrlo široku primjenu u gotovo svim poljima ljudske djelatnosti upravo zbog jedinstvenih svojstava nano estica. Poznato je da smanjenjem veličine estice za određen volumen materijala znatno raste broj atoma na njenoj površini, tj. povećava se omjer površine i volumena. Zbog toga se nano estice koriste u katalizi. Primjerice zlato, iako plemeniti metal u makro dimenzijama, kao nano estice dispergirane u aluminij ili željezo oksidu katalizira oksidaciju ugljikova monoksida. Nadalje, mehaničke i magnetna svojstva nano estica također su jedinstvena upravo zbog omjera površine naspram volumena. Nano estice mogu promijeniti naboj dodavanjem ili oduzimanjem elektrona čak i kad nema napona, odnosno imaju vrlo nisku kapacitanciju te su zbog toga ekstremno osjetljive na susjedne naboje. Nano estice imaju fascinantna optička svojstva i mijenjaju boju u ovisnosti o veličini, konjugiranim molekulama i okolnom mediju. Zbog toga su pronašle primjenu kao optički senzori i kontrastna sredstva. Optička svojstva nano estica proizlaze iz zajedničke oscilacije elektrona vodljive vrpce nano estice koji ekscitirani svjetlošću u momentuma istog njihovom povećaju amplitudu oscilacije. Međutim, amplituda se brzo smanjuje putovanjem kroz dielektrično okoliš. Opažene promjene boje rezultat su dakle apsorpcije prilikom pobuđivanja elektrona. Primarni interes za

nano estice na polju je biologije i medicine. Njihova primjena u dijagnostici, kulturi tkiva i razvoju u inkubitijih na ina primjene lijekova name e potrebu za istraživanjem njihove biokompatibilnosti. To je vrlo zahtjevan posao jer postoje brojni na ini za njihovu sintezu i modifikaciju odnosno funkcionalizaciju te je potreban individualni pristup u istraživanju svake pojedine vrste nano estica. Njihovoj potencijalnoj toksi nost može biti uzrok veli ina, molekule kojima su konjugirane (u eng. literaturi *capping agents*), na in pripreme itd. Uglavnom vrijedi da se smanjenjem veli ine pove ava toksi nost (Prema Shukla R., 2007.)

Prema podrijetlu, nano estice se mogu podijeliti u dvije skupine: sintetizirane s ciljem i one nastale uzgred u proizvodnom procesu, izgranjem goriva te nekim prirodnim pojavama, npr. erupcija vulkana. Tehni ke nano estice (kvantne to ke, dendrimeri) stvorene su radi iskorištavanja svojstava poput vodljivosti, spektralnih svojstava, bioraspodjele karakteristi nih za nanorazinu. Ugljikove nanocjev ice i fulereni mogu pripadati i jednoj i drugoj skupini. Na slici 1. Prikazani su ti ovi nano estica . (Prema Ivankovi M., 2011.)



Slika 1. Vrste nano estica

Nanotoksikologija kao grana znanosti unutar nanotehnologije ima za cilj odrediti potencijalne štetne uinke nano estica na organizme kao i sudbinu nano estica u okolišu. Istraživanja se temelje na prouavanju citotoksi nosti, imunotoksi nosti i imunogeni nosti nano estica in vitro i in vivo. Neki od mogu ih dosad opaženih patofizioloških u inaka nano estica prikazani su u tablici 1. (Preuzeto i prilago eno prema Shukla R. 2007.)

Tablica 1. Toksi ni i patofiziološki u inci nanomaterijala

Eksperimentalni efekti NM	Mogući patofiziološki učinci
Stvaranje ROS	Oštećenje membrane, proteina i DNA, oksidativni stres
Oksidativni stres	Indukcija enzima faze 2., upala, perturbacija mitohondrija
Perturbacija mitohondrija	Oštećenje unutarnje membrane, promjene u permeabilnosti otvaranje pora, energetske kolaps, nekroza, apoptoza
Upala	Nakupljanje upalnih stanica u tkivu, fibroza, stvaranje granuloma, aterogeneza, ekspresija proteina akutne faze (C-reaktivni protein)
Nakupljanje u retikulo-endotelnom sustavu	Asimptomatična sekvestracija i pohrana u jetri, slezeni, limfnim čvorovima, povećanje tih organa i njihova disfunkcija
Denaturacija i degradacija proteina	gubitak enzimske funkcija, autoantigeničnost
Ulaz u jezgru	Oštećenje DNA, agregacija nukleoproteina, autoantigeni
Prodor u živčano tkivo	Oštećenje mozga i perifernog živčanog sustava
Kronična upala, fibroza, stvaranje granuloma, prezasićenost nanočesticama, otpuštanje medijatora	interferencija u oslobađanju organizma od patogena
Disfunkcija endotela, učinci na zgrušavanje krvi	Disfunkcija endotela, učinci na zgrušavanje krvi
Stvaranje neoantigena, smanjivanje imunotolerancije	autoimunost, efekt adjuvansa
Oštećenje DNA	mutageneza, metaplazija, karcinogeneza

Nano estice plemenitih metala lako se pripremaju, jednostavno biokonjugiraju i njihova se optička svojstva mogu kontrolirati. Nano estice zlata odavno se koriste u vizualiziranju tvari njihovim komponentama elektronskom mikroskopijom. Nadalje, pokazalo se da nano estice zlata posebne strukture zbog svojih apsorpcijskih svojstava selektivno ubijaju stanice raka in vivo primjenom laserske radijacije. (Preuzeto iz Shukla R. 2007.). Zbog svega spomenutog cilj je ovog pregleda napraviti rezime nekih dosadašnjih saznanja o ponašanju nano estica srebra i zlata unutar i izvan stanice te o njihovoj biokompatibilnosti.

2.1 Stabilnost nano estica zlata ovisi o površinskim konjugatima

Sumistha Das i suradnici (2012) nedavno su pokazali da stabilnost nano estica zlata u različitim medijima direktno ovisi o površinskim konjugatima. Oni su istraživali agregaciju nano estica zlata konjugiranih aspartatom (GNPA), trinatrij-citrat dihidratom (GNPC) i albuminom te eg serumu (GNPB) pri različitim pH vrijednostima i ionskim jakostima u različitim medijima (PBS, NaCl, HEPES). Spektroskopski su pokazali da su GNPB stabilne i pri

kiselom i pri bazi nom pH, dok GNPA i GNPC aglomeriraju pri jako kiselom pH (pH 1). Nadalje, GNPB pokazale su se najstabilnijima pri svim razmatranim koncentracijama triju korištenih medija. GNPA i GNPC stabilne su u HEPES-u, a aglomeriraju u NaCl-u i PBS –u pri koncentraciji od 50 mM ili višoj. Ova saznanja vrlo su bitna za sintezu odgovaraju ih nano estica za biološku uporabu. Injenica da serumski albumin štiti od aglomeracije daje naslutiti isti slučaj u sustavima in vivo.

2.2 In vitro studije citotoksi nosti nano estica zlata

Sumistha Das i suradnici (2012) analizirali su citotoksi nost spomenuta tri tipa nano estica (GNPA, GNPB i GNPC) na stani noj liniji ljudskih fibroblasta koriste i tetrazolijsku sol WST-1 (4-[3-(4-jodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolij]-1,3-benzen disulfon) koju reducira mitohondrijski enzim suksinat-reduktaza na ljubi asti produkt formazan u živim stanicama što se mjeri spektrofotometrijski. Za sva tri tipa nano estica opažena je blaga citotoksi nost u ovisnosti o dozi. Pri 51 ppm GNPA, GNPB i GNPC, 93, 98 i 91% stanica je bilo vijabilno. Pri 5,000 ppm 76, 77 i 70%. Dakle, LD₅₀ nije utvr ena ni pri tako visokoj dozi. Sli ne rezultate dobili su i LDH testom. Laktat-dehidrogenaza (LDH) je topljivi stani ni enzim koji se otpušta u okolni medij kada je membrana ošte ena stoga se mjerenjem njegove aktivnosti u mediju dobivaju podaci o integritetu membrane odnosno vijabilnosti stanica. Sumistha Das i suradnici spominju u svom radu i neke druge studije kojima je utvr ena necitotoksi nost nano estica zlata razli itih u promjeru (4, 12, 18 nm) i razli ito konjugiranih (citrat, cistein, glukoza, biotin, cetiltrimetil-amonij-bromid) na ljudskim tumorskim limfoblastima (Connor et al. 2005.). Shukla Ravi i suradnici (2007) prou avali su citotoksi nost nano estica veli ine 3-4 nm dobivenih redukcijom vodikovog tetrakloroaurata natrij-borhidridom. Mišji tumorski makrofagi, normalni makrofagi štakora, ljudske epitelne stanice raka dojke, epitelne stanice ribe i ljudski fibroblasti izloženi su rastu im koncentracijama nano estica tijekom 48 sati. Testom ekskluzije tripanskog modrila nije utvr ena citotoksi nost osim kod ljudskih fibroblasta koji pokazuju marginalnu citotoksi nost pri koncentraciji od 200 µM. Naime, postotak vijabilnosti ljudskih fibroblasta pri toj konc. iznosio je otprilike 65%. Ovo saznanje daje mogu nost korištenja nano estica zlata u selektivnom uzgoju stanica epitela, prije avanju kontaminacije kultura stanica fibroblastima te u cijeljenju rana za prije avanje stvaranja ožiljaka.

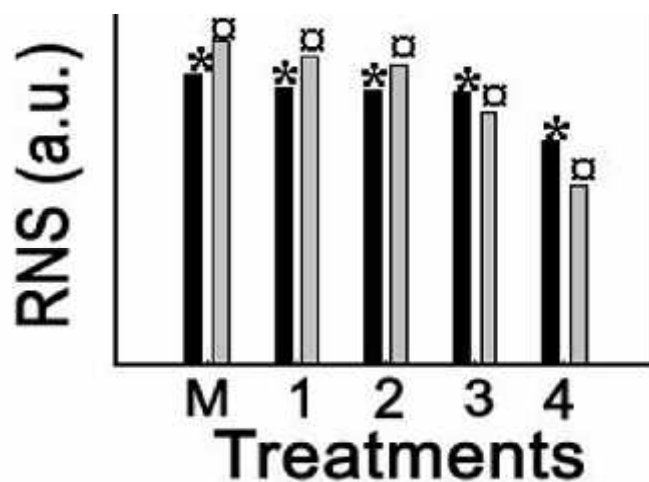
Deleted:

2.3 Imunogeni nost nano estica zlata

Citotoksi nost nije jedini mehanizam djelovanja nano estica. One mogu izazvati druge morfološke i funkcijske poreme aje stoga je potrebno pri utvr ivanju njihove potencijalne štetnosti uzeti u obzir i druge parametre, kao što je njihov utjecj na imunološki sustav. Shukla

Ravi i suradnici (2007) proučavali su indukciju stvaranja RNS (reaktivni dušikovi intermedijeri) i ROS (reaktivni kisikovi intermedijeri) u mišjim tumorskim makrofagima tretiranim rastu i koncentracijama koloidnog zlata tijekom 24 i 48 sati.

Makrofagi su glavne imunoregulacijske stanice i ine prvu crtu obrane protiv stranih antigena u mnogim tkivima, kao što su pluća, jetra, mozak i krv. Njihova uloga u nespecifičnoj imunosti temelji se na fagocitozi. Mehanizmi kojima aktivirani makrofagi uništavaju i inaktiviraju mikroorganizme i druge strane stanice jesu respiratorna eksplozija kojom se stvaraju reaktivni kisikovi radikali i vodikov peroksid, zatim stvaranje dušikovog oksida dušik-oksida sintazom te degranulacija i otpuštanje lizosomskih enzima na površinu ciljne stanice. U slučaju endocitoze nano estica makrofagima prva dva mehanizma obrane mogla bi biti inducirana (Prilagođeno prema Shukla R., 2007.). Međutim, rezultati istraživanja pokazuju čak na smanjenje razine RNS u ovisnosti o dozi i vremenu tretmana koloidnim zlatom kao što je vidljivo iz podataka na slici 2. (Preuzeto i prilagođeno prema Shukla R., 2007.)



Slika 2. Određivanje koncentracije dušikovog oksida u supernatantu kulture mišjih tumorskih makrofaga Griessovim reagensom nakon 24(*) i 48h(□) primjene 10, 25, 50 i 100μ nano estica zlata.

Proizvodnja ROS mjerena je protokom citometrijom na fluorescencijom aktiviranom razvrstava u stanica. ROS su esencijalni intermedijeri oksidativnog metabolizma, ali pretjerano proizvedeni peroksidiraju lipide, narušavaju strukturu proteina, enzima i nukleinskih kiselina. Protokom citometrom vizualizirana je internalizacija nano estica zlata u mišjim tumorskim makrofagima u ovisnosti o dozi i vremenu na temelju razlika u raspršivanju svjetlosti. Makrofagi koji su sadržavali nano estice zlata razvrstavani su citometrom prema razini fluorescencije koja je direktno ovisna o proizvodnji ROS. Naime, 2,7-dikloro-dihidro-fluorescein-diacetat (H₂DCF-

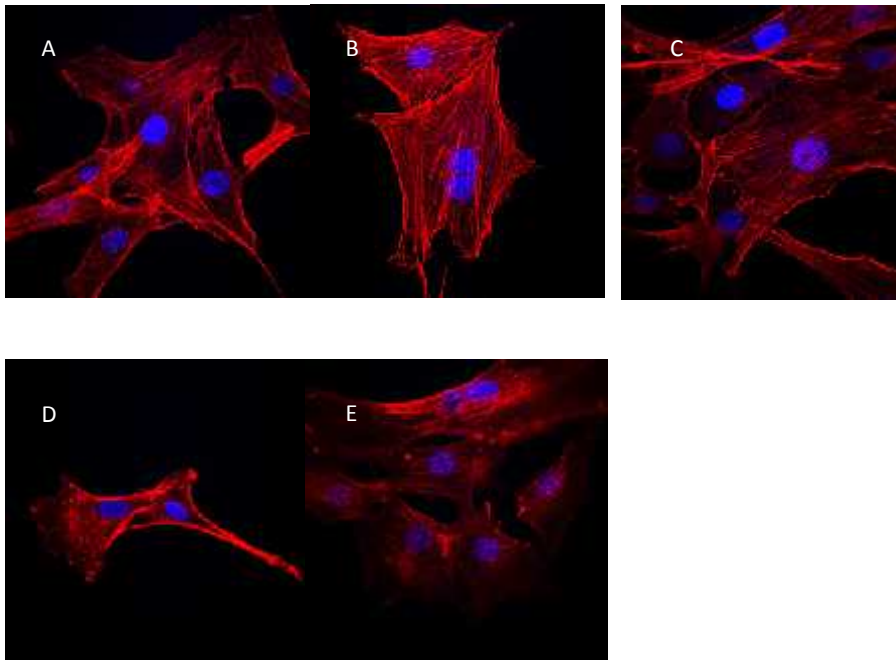
DA) kojim su tretirani stani ne esterase makrofaga cijepaju na nefluorescentni 2,7-dikloro-dihidro-fluorescein (H_2DCF) koji se u prisutnosti vodikovog peroksida oksidira na fluorescentni 2, 7-diklorofluorescein (DCF). (Preuzeto i prilagođeno prema <http://www.protocol-online.org/biology-forums-2/posts/13855.html>). Opaženi rezultati poklapaju se s rezultatima za RNS, odnosno pokazuju smanjenje ROS pri već ojoj koncentraciji nano estica zlata ($100\mu M$) i produljenom vremenu izloženosti (48h). Shukla Ravi i suradnici uspoređuju svoje rezultate s rezultatima jedne prijašnje studije kojom je utvrđeno da nano estice zlata (Au) onemogućuju vezivanje transkripcijskih faktora AP-1 i NF- κ B i time negativno reguliraju ekspresiju seta gena uključenih u sintezu receptora interleukina-2 i drugih upalnih citokina s posljedicom smanjenja proizvodnje RNS i ROS. Pretpostavljaju sličnost u mehanizmu djelovanja ispitivanih nano estica zlata (Au^0) sa spomenutim (Au). Takvi rezultati upućuju na antioksidacijsko djelovanje ispitivanih nano estica zlata (Au^0) što bi moglo biti od koristi u tretiranju autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa. (Preuzeto i prilagođeno prema Shukla Ravi 2007.).

Imunogeni i citotoksičnost nano estica zlata testirana je i provedena u proučavanju i proizvodnji upalnih citokina TNF- α i IL- 1β na razini mRNA (nakon 3h) i proteina (nakon 24h) mišje tumorske stanice linije makrofaga. RT-PCR-om (reverzna transkriptaza PCR) nije utvrđena mRNA niti za jedan od dva spomenuta citokina, niti su bili dokazani proteinski produkti metodom ELISA za koncentracije nano estica do $100\mu M$. Uz spomenute studije citotoksičnosti i imunogeni testovi napravljeni su i profil stanica i njihovih proteina makrofaga tretiranih nano esticama zlata konc. $100\mu M$ na SDS-PAGE-u koji se nije razlikovao od proteinskog profila netretiranih makrofaga iz čega je jasno da nano estice zlata konc. do $100\mu M$ nemaju utjecaj na stanične funkcije i metabolizam makrofaga. (Prema Shukla Ravi 2007.)

2.4 Utečaj nano estica zlata na staničnu morfologiju

Stanični citoskelet važan je za lokomotivnu, endocitozu, unutarstanični prijenos proteina, oblik i morfologiju stanice, obrambene mehanizme i prijenos signala. Glavni su komponente aktinski filamenti promjera 7 nm (F aktin) izgrađeni od po dvije monomerne jedinice globularnog aktina (G aktin) u nizu. Aktinski tubuli nalaze se po cijeloj stanici, ali ih je najviše u kortikalnoj regiji ispod plazma membrane. Mišji fibroblast uzgajani na staklu tretirani su nano esticama zlata konc. 50 i $100\mu M$ tijekom 48 i 96h. Obilježeni su faloidin-tetrametilrodamin-izotiocijanatom (faloidin-TRITC; faloidin veže aktinske tubule, TRITC fluorescira narančasto) i promatrani pod mikroskopom. Manjak aktinskih filamenata zbog depolimerizacije ili poremećaja u sintezi opažen je na fibroblastima izloženim višim koncentracijama nano estica zlata ($100\mu M$) kroz

dulje vrijeme (96h). Potpuno smanjenje veličine fibroblasta i eventualna stanja na smrt opažena je u tretmanu prekursorom nanoestica zlata, tetrakloroaurinom kiselinom. Slika 3. zorno sumira rezultate. (Preuzeto i prilagođeno prema Shukla R., 2007.).



Slika 3. Mikroskopske slike aktinskog citoskeleta (crveno). (C) netretirana kontrola nakon 96h, (B) konc. nano estica zlata 100 μ M, 48h, (D) 100 μ M, 96h, (A) 50 μ M, 96h, (E) 50 μ M HAuCl₄, 48h. Jezgra je bojana DAPI-em.

2.5 Akutna oralna toksičnost nanoestica zlata u miša

In vitro metode istraživanja toksičnosti imaju određena ograničenja pa ih valja usporediti s testovima in vivo. Sumistha Das i suradnici (2007) testirali su toksičnost tri već spomenuta tipa nanoestica na modelu miša proučavajući i hematološke vrijednosti i histopatologiju jetre i bubrega. Sva tri tipa nanoestica povisila su razinu hemoglobina u krvi dok je koncentracija crvenih krvnih stanica ostala nepromijenjena što upućuje na stresni odgovor. Tretman sa GNPC i GNPA povisio je broj limfocita. Razina jetrenog enzima serumske glutamin-oksaloacetat transaminaza (SGOT) povišena je tretmanom sa GNPA, a uz nju tretmanom sa GNPC i serumske glutamin-piruvat transaminaza (SGPT) što ukazuje na poremećaj u radu jetre. Zdravlje bubrega, odnosno pravilna glomerularna filtracija ogleda se razinom kreatinina, mokraćne kiseline i dušika podrijetlom iz uree (BUN) u krvi. Kod tretmana sa GNPC povišena je razina BUN-a. Vrijednosti svih mjerenih parametara prikazani su u tablicama 2., 3. i 4. (Preuzeto i prilagođeno prema Sumistha Das i suradnici, 2012.)

Tablica 2. Hematološka analiza kontrolnih i miševa tretiranih nano esticama zlata

Parametri	Kontrola	GNPA	GNPB	GNPC
Hemoglobin	13.5 ± 0.45	16.1 ± 0.6*	15.6 ± 0.7*	15.7 ± 1.2*
Uk. br. Eritrociti (X 10 ⁶ mm ⁻³)	4.1 ± 0.4	4.6 ± 0.7	4.3 ± 0.3	5.1 ± 0.2
Leukociti (X 10 ² mm ⁻³)	56 ± 0.07	58 ± 0.17	56.8 ± 0.11	57.3 ± 0.4
DKS (%)				
Neutrofili	42 ± 3	43 ± 4	44 ± 1	42 ± 1
Limfociti	53 ± 1	64 ± 4*	52 ± 3	66 ± 3*
Monociti	2	2	2	2
Eozinofili	3 ± 0.57	2	3 ± 0.57	2
Bazofili	0	0	0	0
Trombociti (X 10 ⁵ mm ⁻³)	1.54 ± 0.04	1.56 ± 0.03	1.52 ± 0.03	1.6 ± 0.02
Sedimentacijska stopa eritrocita (1h)	12 ± 1	10 ± 1	12 ± 2	12 ± 2
SSE (2h)	16 ± 3	16 ± 5	16 ± 1	15 ± 1

*zna ajna razlika u odnosu na kontrolu, P < 0.05

Tablica 3. U inak nano estica zlata na jetrene enzime

Parametri	Kontrola	GNPA	GNPB	GNPC
Alkalna fosfataza (U/L)	60 ± 2	62 ± 2	61 ± 4	59 ± 2
SGOT (U/L)	12 ± 2	19 ± 2*	11 ± 1	21 ± 3*
SGPT(U/L)	11 ± 10	14 ± 5	13 ± 1	22 ± 7*

* zna ajna razlika u odnosu na kontrolu, P < 0.05

Tablica 4. *Učinak nano estica zlata na parametre bubrega*

Parametri	Kontrola	GNPA	GNPB	GNPC
Kreatinin (mg/dl)	0.71 ± 0.03	0.76 ± 0.08	12 ± 1	11 ± 2
Mokra na kiselina (mg/dl)	2.9 ± 0.1	2.6 ± 0.6	3.0 ± 0.1	3.1 ± 0.1
BUN (mg/dl)	10 ± 2	12 ± 1	11 ± 2	16 ± 3*

* značajna razlika u odnosu na kontrolu, $P < 0.05$

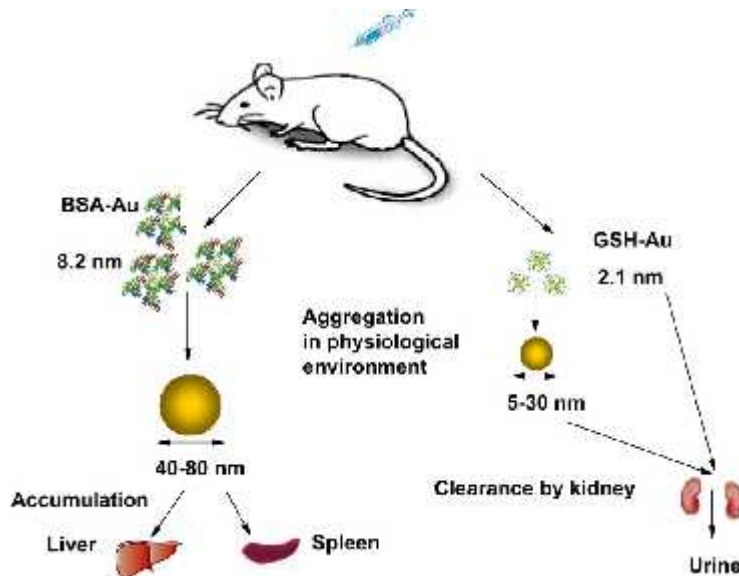
Histopatološke promjene na jetri uočene su pri tretmanu sa GNPA i GNPC. One uključuju infiltraciju upalnih stanica u portalnu trijadu, dilataciju sinusoida, vrlo proširenu centralnu venu prepunu krvi, natečene hepatocite s poremećajem u metabolizmu masti zbog njihove peroksidacije i posljedično uništenja endoplazmatske mrežice. Sve su ovo značajke imunogenog odgovora protiv stranih nano estica.

Promijenjena histologija bubrega u studiji koju su proveli Sumistha Das i suradnici sastoji se u anizokariozi i vakuolizaciji nekih stanica bubrežnih tubula kao rezultat tretmana sa GNPC. Nikakve histopatološke promjene nisu utvrđene u tkivima jajnika, testisa, srca, pluća i slezene niti za jedan od tri tipa nano estica zlata. Vjerojatno je da jetra i bubrezi pokušavaju oštetiti organizam od nano estica i tako zapravo sprječavaju sekundarne i tercijarne patološke promjene na drugim organima. Moguće je da su najizraženije histopatološke promjene u jetri kao što je proširena centralna vena rezultat povećanog ulaska vode i iona natrija u stanice. (Prema Sumistha Das i suradnici, 2012.)

2.6 Biodistribucija i bubrežna ekskrecija nano estica zlata

Xiao-Dong Zhang i suradnici (2012) proveli su in vivo studiju s različito konjugiranim nano esticama zlata sliče na ranije opisanoj s jednog novog aspekta. Proučili su tendenciju nakupljanja nano estica u jetri i slezeni i toksičnost u tkivima uzrokovane. Zanimalo ih je kako veličina i konjugati utječu na širenje tkiva od nano estica i njihov eventualni izlazak iz organizma. Mjerili su hematološke i biokemijske parametre kod miševa tretiranih nano esticama zlata konjugiranih goveim serumskim albuminom (BSA-NP) i glutationom (GSH-NP) koncentracije 7550 µg/kg nakon 24h i 28 dana. Pokazali su da se BSA-NP uglavnom nakuplja u jetri i slezeni, dok je relativno niska koncentracija GSH-NP bila prisutna u svim organima. Nakon 24h 36% GSH-NP, a samo 1% BSA-NP izbačeno je iz organizma urinom. Nakon 28 dana taj

omjer iznosi 94% : 5%. Povišenje količine bijelih krvnih stanica opaženo je za oba tipa nano estica nakon 24h. Također je povišena razina kreatinina što ukazuje na toksičnost u inak BSA-NP i GSH-NP na bubreg. Međutim, nakon 28 dana toksičnost u inak GSH-NP eliminirani su jer one očigledno mogu biti uspješno metabolizirane, dok to nije slučaj sa BSA-NP koje su i nakon tog vremena ostale u bubregu i jetri izazivajući upalu. Slika 4. Vrlo lijepo sumira rezultate (Preuzeto iz Xiao-Dong Zhang i suradnici, 2012.). Prethodno opisana studija akutne oralne toksičnosti nano estica zlatne oznake je biokompatibilnim nano esticima zlatne konjugirane goveim serumskim albuminom, ali je iz istraživanja biodistribucije vidljivo da se teško metaboliziraju te stoga ne mogu biti primjenjive na polju biomedicine.



Slika 4. Biodistribucija i bubrežna ekskrecija BSA i GSH konjugiranih nano estica zlatne.

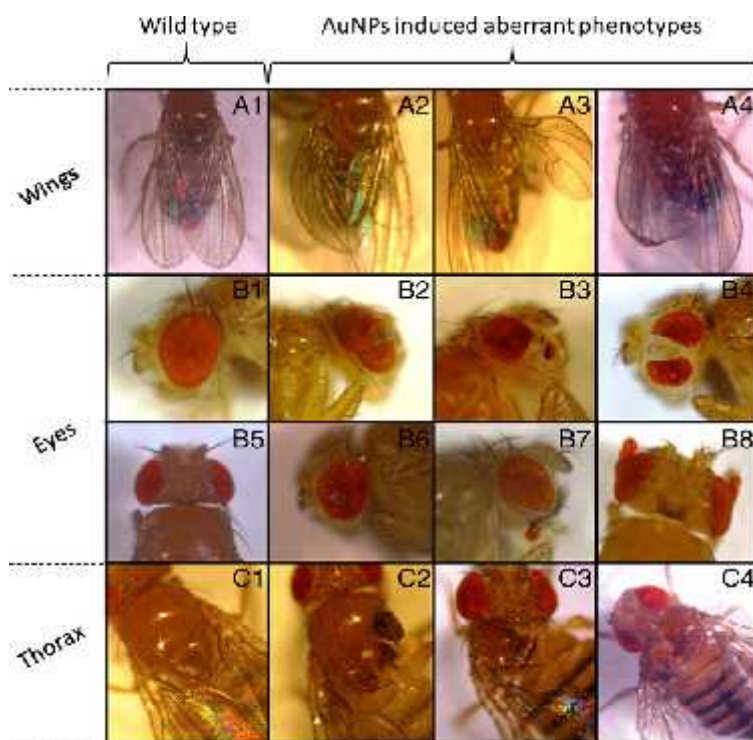
2.7 Genotoksičnost nano estica zlatne

Markus Shulz i suradnici (2012) proučavali su genotoksičnost nano estica zlatne veličine 2, 20 i 200nm komet i mikronukleus testom na polikromatskim eritrocitima koštane srži i stanicama pluća štakora. Nano estice su u miševu unošene intratrahealno pod narkozom te su nakon 72 h provedena mjerenja. Tkivo pluća bilo je prvo na „udaru“ nano estica, ali komet testom nije utvrđen genotoksičnost u inak na stanice pluća. Naime, intenzitet repa (postotak DNA u repu) za sva tri tipa nano estica nije se statistički značajno razlikovao od kontrole. Također, mikronukleus testom na stanicama koštane srži nije utvrđen klastogeni ili aneugeni u inak uzrokovan nano esticima. Međutim, autori ove studije spominju potrebu za utvrđivanjem genotoksičnosti nano estica zlatne u tkivima jetre i slezene kao organima u kojima se primarno dešava bioakumulacija tih nano estica. Također upućuju na općeniti zaključak autora jedne

druge provedene studije o utjecaju veličine na toksičnost. Male nano estice inaktivirane su imunološkim odgovorom, nano estice srednje veličine nakupljaju se u različitim organima uzrokujući citotoksičnost dok veće nano estice uglavnom ne prolaze tkivnu barijeru.

2.8 Mutageni učinak nano estica zlata na modelu vinske mušice

Giuseppe Vecchio i suradnici (2012) tretirali su vinske mušice nano esticama zlata veličine 15 nm. Ustanovili su genotoksičnost učinak na hemocitima koji su analogni limfocitima sisavaca i imaju istu funkciju. Fragmentaciju DNA utvrdili su TUNEL testom, a čak 15% hemocita proučavanih aneksinom V/PI testom bilo je apoptotično. Mjerili su razinu ekspresije proteina p53 koji se povezuje sa stresnim odgovorom stanice i oštećenjem DNA real-time PCR-om te i tu dobili potvrdu genotoksičnosti jer je se ekspresija povećala čak tri puta kod tretiranih mušica u odnosu na netretirane. Ovi rezultati potaknuli su ih da prouče dugotrajniji mutageni potencijal nano estica zlata. Tretirali su mušice kroz cijeli životni ciklus i ustanovili smanjenu fertilitnost, smanjenu vijabilnost zbog letalnih mutacija i nasljedne promjene u fenotipu kao što su abnormalna krila, toraks i oči (slika 5.). Mutacije u podlozi opaženih fenotipskih aberacija pokazale su se dominantnima križanjem s mušicama divljeg tipa gdje je potomstvo imalo 50% promijenjeni, 50% fenotip divljeg tipa. (Prema Giuseppe Vecchio i suradnici, 2012.)

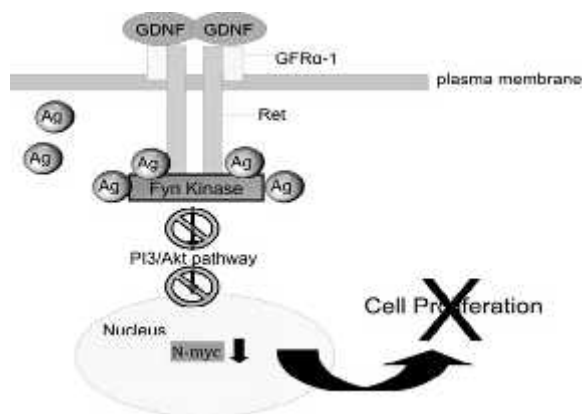


Slika 5. Mutageni učinak nano estica zlata na fenotip vinske mušice

3.1 In vitro studije toksičnosti nano estica srebra

Zbog njihovog antimikrobnog djelovanja, nano estice srebra danas se naširoko koriste u raznovrsnim komercijalno dostupnim proizvodima koji su namijenjeni direktnom kontaktu s kožom stoga je posebno zanimljivo istraživanje koje su proveli Caterina Zanette i suradnici o u inku koji nano estice srebra imaju na ljudske keratinocyte. Nakon što su 24h bili izloženi nano esticama srebra MTT testom izmjerena je smanjena aktivnost mitohondrija pri konc. od 100 i 330 μM . Sli ni rezultati dobiveni su istraživanjem toksičnosti u inka nano estica srebra i na drugim tipovima stanica, ljudskim i štakorskim stanicama jetre, alveolarnim makrofagima, na fibroblastima, germinativnim i stanicama jetre miša navode u svom radu Caterina Zanette i suradnici. Nadalje, SRB testom mjerili su ukupni sadržaj stanih proteina, odnosno indeks stani ne biomase koja je bila ponešto smanjena nakon izlaganja najvećoj konc. nano estica srebra. Smanjenje intenziteta fluorescencije DAPI-em obojanih jezgri u suglasju je sa ostalim testovima opaženim smanjenjem broja keratinocita. Pokazano je da smanjenje vijabilnosti keratinocita osim o koncentraciji ovisi i o vremenu izloženosti tih stanica nano esticama srebra. Iz navedenih rezultata i na temelju nekih drugih provedenih studija kojima je utvrđena kromosomska nestabilnost i zastoj u G2 fazi kao posljedica izloženosti nano esticama srebra autori zaključuju da one imaju antiproliferacijski učinak na keratinocyte (Caterina Zanette i suradnici, 2012.).

Laura K. Braydich-Stolle i suradnici (2012) pokazali su da nano estice srebra smanjuju vijabilnost i proliferaciju zametnih stanica sperme u ovisnosti o veličini i koncentraciji te da konjugati nano estica zapravo nemaju utjecaj na toksičnost jer se degradiraju u lizosomima s mogućom posljedicom otpuštanjem iona srebra koji su sami po sebi toksični. Nadalje, utvrđeno je proizvodnja reaktivnih kisikovih radikala kao posljedica izloženosti stanica manjim nano esticama srebra koja vodi putem apoptoze zbog oštećenja DNA i aktivacije stanih kaspaza. Stvaranje ROS ne objašnjava potpuno opaženu smanjenu proliferaciju i vijabilnost pa su autori proučavali utjecaj nano estica srebra na GDNF signalni put. GDNF je faktor rasta bitan za proliferaciju zametnih stanica sperme i pokazalo se da nano estice srebra neovisno o veličini i konjugatima inhibiraju aktivnost Fyn kinaze ovog signalnog puta onemogućujući i signalne učinke proizvedene od Fyn kinaze kao što pokazuje slika 5. (Preuzeto i prilagođeno prema Laura K. Braydich Stolle i suradnici 2012.)



Slika 5. Molekularni mehanizam inhibicije proliferacije zametnih stanica sperme nano esticama srebra.

3.2 In vivo studije toksikosti nano estica srebra

Za sada nema baš puno studija in vivo o toksikosti nano estica srebra i veina ih je proveden na vodenim organizmima. Tako ih veina prati toksikologija u inak ionskog srebra jer se vjeruje da je taj oblik srebra bioaktivniji.

Kod zebrića (*Danio rerio*) se toksikost nano estica srebra u ovisnosti o dozi (0.19 nM se pokazala kritičnom) očituje različitim abnormalnostima u embriju (deformacije kralježnice, srčana aritmija te smanjeno preživljenje). Zbog izmjerene pretjerane ekspresije katalaze ovi uinci pripisani su stvaranju ROS s posljedicom oštećenjem DNA. (Prema A. Lapresta-Fernandez i suradnici, 2011.). Kod grgega (*Perca fluviatilis*) je utvrđeno da se nano estice srebra veličine 81 nm konjugirane PVP-om (polivinilpirolidon) akumuliraju u škrgama i smanjuju toleranciju na hipoksične uvjete. U pastrve (*Salmo trutta*) je uočeno stvaranje ROS u tkivu škrge pri tretmanu nekonjugiranim nano esticama srebra veličine 10-35 nm. (Prema pregledu Julie Fabrega i suradnika, 2010)

3.3 Molekularni mehanizmi toksikosti nano estica srebra

Toksikologija uinci nano estica srebra i iona srebra koji se iz njih u određenim uvjetima (pH, ionska jakost, temperatura) otpuštaju ogledaju se u proizvodnji ROS te poremećajem u ionskoj ravnoteži stanica i posljedicom energetske kolapsu zbog narušenog membranskog integriteta kroz interakciju tiolnih grupa proteina membrane sa spomenutim nano esticama (Prema A. Lapresta Fernandez i suradnici, 2011.)

4. Zaključak

Toksičnost nanoestica zlata i srebra ovisi o njihovoj veličini i konjugiranim molekulama. Fiziološki uvjeti u organizmu (pH, temperatura, ionska jakost) utječu na stupanj agregacije i time na njihovu mogućnost ulaska u stanicu. Stabilizacija i sprječavanje agregiranja postiže se upravo konjugacijom s najrazličitijim molekulama o kojima ovisi biodistribucija i mogućnost razgradnje i bubrežne ekskrecije. Međutim, jednom u stanici, lizosomski enzimi mogu vrlo lako razgraditi konjugate nanoestica stoga se na to treba obratiti posebna pažnja pri sintezi i istraživanju biokompatibilnih nanoestica za medicinske potrebe. Općeniti molekularni mehanizmi toksičnosti nanoestica zlata i srebra sastoje se u produkciji ROS i RNS (oksidativni stres), narušavanju stabilnosti membrana i poremećenom protoku iona s posljedičnim energetske kolapsom te oštećenjem DNA (bilo zbog direktnog djelovanja nanoestica ako su dovoljno male da uđu u jezgru ili kao posljedica oksidativnog stresa). Dakako, postoje još mnogi nedovoljno istraženi specifični toksični učinci nanoestica kao što je njihova uloga u regulaciji genske ekspresije te najrazličitiji učinci na metabolizam stanice zbog specifičnih interakcija nanoestica s proteinima koji su ovisni o veličini i konjugatima pa je svaku novosintetiziranu nanoesticu potrebno individualno odrediti. Zbog svega ovoga, teško je utvrditi opću proceduru karakterizacije nanoestica koja može biti kompletna jedino ako određuje biološku dostupnost koju određuju okolišni čimbenici te međuvrsne razlike u sveukupnim toksičnim učincima što predstavlja veliki izazov znanstvenicima koji se bave ovim područjem.

5. Literatura

- Lapresta-Fernandez A., Fernandez A., Blasco J., 2011. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 32, 2012, 40-59.
- Zanette C., Pelin M., Crosera M., Adami G., Bovenzi M., Filon Larese F., Florio C. (2011) Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line. *Toxicology in Vitro* 25: 1053–1060.
- Vecchio G., Galeone A., Brunetti V., Maiorano G., Rizzello L., Sabella S., Cingolani C., Pompa P., 2012. Mutagenic effects of gold nanoparticles induce aberrant phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8, 1–7.
- Fabrega J., N. Luoma S., R. Tyler C., S. Galloway T., R. Lead J., (2010). Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International* 37 (2011) 517–531.
- Ivankovi M. (2011.), Nanomaterijali i nanoproizvodi, mogu nosti i rizici. *Polimeri*, vol. 32, 23-28.
- K. Braydich-Stolle L., Lucas B., Schrand A., C. Murdock R., Lee T., J. Schlager J., M. Hussain S., Claude Hofmann M., (2010). Silver Nanoparticles Disrupt GDNF/Fyn kinase Signaling in Spermatogonial Stem Cells. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 116(2), 577–589.
- Schulz M., Ma-Hock L., Brill S., Strauss V., Treumann S., Gröters S., Van Ravenzwaay B., Landsiedel R., (2012). Investigation on the genotoxicity of different sizes of gold nanoparticles administered to the lungs of rats. *Mutation Research* 745, 51– 57.
- Shukla R., (2007.) Studies on assessment of biocompatibility of Gold and Silver nanoparticles in cell culture for tissue engineering applications.
- Das S., Debnat N., Mitra S., Datta A., Goswami A., (2012). Comparative analysis of stability and toxicity profile of three differently capped gold nanoparticles for biomedical usage. *Biometals*, DOI 10.1007/s10534-012-9567-1
- Zhang X-D., Wu D., Shen X., Liu P-X., Fan F-Y., Fan S-J., (2012). In vivo renal clearance, biodistribution, toxicity of gold nanoclusters. *Biomaterials* 33 4628-4638.
- <http://www.protocol-online.org/biology-forums-2/posts/13855.html>

6. SAŽETAK

Nanotehnologija se bavi esticama veličine do 100 nm zbog njihovih novih zanimljivih svojstava u odnosu na materijale makro dimenzija. Predmetom su proučavanja zbog potencijalne primjene u medicinske i druge najrazličitije svrhe. Nano estice srebra se već koriste u komercijalne svrhe u raznim antibakterijskim sredstvima, a nano estice zlata pokazuju potencijal za korištenje u dijagnozi i liječenju raka pa je bitno utvrditi njihove potencijalno toksične učinke na živi svijet. S tim ciljem rađena su istraživanja in vitro i in vivo na različitim modelima kojima je pokazano da se nano estice srebra i zlata akumuliraju u jetri i slezeni, da mogu izazvati imunološki odgovor te djelovati toksično ovisno o veličini, konjugatima, koncentraciji i vremenu izloženosti tkiva i organa. Toksični učinci nano estica srebra i zlata su indukcija proizvodnje ROS i RNS, narušavanje integriteta membrane i oštećenje DNA iako postoje i drugi specifični učinci koje još valja istražiti. Nano estice srebra označene su toksičnijim od onih zlata jer lakše oksidiraju.

7. SUMMARY

Nanotechnology manipulates material at nanoscale (1-100 nm) for its interesting novel properties comparing to those of the materials in macro dimensions. Nanoparticles receive much interest due to their potential applications in medicine and many other fields. Silver nanoparticles are commercially available in various antibacterial products while gold nanoparticles show great potential in cancer treatment and diagnostics. Thus, it is essential to determine possible toxic effects that silver and gold nanoparticles can have on both humans and wildlife. Following that purpose, experiments that have been taken on various different in vitro and in vivo models have shown that silver and gold nanoparticles tend to accumulate in spleen and liver, that they can stimulate immune response and can exert toxic effects depending on the size and capping agents of the particle, as well as on the dose and time of exposure. ROS and RNS production, membrane and DNA damage are some general effects silver and gold nanoparticles can have on cells, although there are many other specific effects that need further investigation. It is believed that silver nanoparticles are more toxic than the gold ones because they oxidize more readily.